

Aus dem Eidgenössischen Vakzine-Institut, Basel
(Leiter: Dr. U. Kihm)
und dem Institut für Virologie der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. R. Wyler)

IMMUNISIERUNGSVERSUCHE MIT AFRIKANISCHEM SCHWEINEPESTVIRUS-ANTIGEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
ROMANO POOL
Tierarzt
von Vicosoprano GR

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. R. Wyler, Referent
Prof. Dr. Hans Keller, Korreferent

Zürich 1986
Zentralstelle der Studentenschaft

Aus dem Eidgenössischen Vakzine-Institut, Basel
(Leiter: Dr. U. Kihm)
und dem Institut für Virologie der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. R. Wyler)

IMMUNISIERUNGSVERSUCHE MIT AFRIKANISCHEM SCHWEINEPESTVIRUS-ANTIGEN

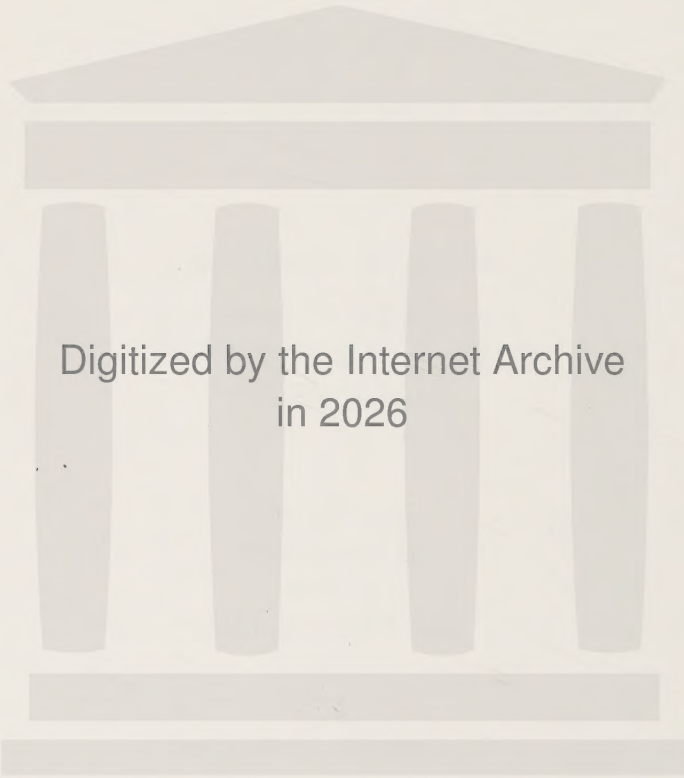
Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
ROMANO POOL
Tierarzt
von Vicosoprano GR

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. R. Wyler, Referent
Prof. Dr. Hans Keller, Korreferent

Zürich 1986
Zentralstelle der Studentenschaft



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	1
1. Krankheit und Erreger	1
2. Klinik und Pathologie	1
3. Epidemiologie	2
4. Virulenz	3
5. Diagnose und Bekämpfung	4
6. Immunisierung	4
7. Ziel der Arbeit	5
II. MATERIAL UND METHODEN	6
1. Tiermaterial und Haltung	6
2. Schweineleukozytenkultur	6
3. Virus	7
4. Antigen-Präparate	7
4.1. Organ-, Erythrozyten-, und Leukozytensuspensionen	7
4.2. Inaktivierung	8
4.3. Adjuvantien	9
4.4. Applikation	9
5. Serologie	10
5.1. Indirekte Immunfluoreszenz	10
5.2. Immunoelektroosmophorese	10
5.3. Enzyme Linked Immunosorbent Assay	11
6. Virusisolation	11
6.1. In vitro Virusnachweis	11
6.1.1. Virusisolierung aus dem Serum	11
6.1.2. Virusisolierung aus Erythrozyten und Leukozyten	11
6.1.3. Virusisolierung aus Organen	11
6.2. In vivo Virusnachweis	12

III. RESULTATE	13
1. Eigenschaften der hergestellten Antigen-Präparate	13
1.1. Virusfreiheit der Antigen-Präparate	13
1.2. Verträglichkeit der Antigen-Präparate	13
2. Immunisierungsversuche und artifizielle Infektionen	14
2.1. Klinischer Krankheitsverlauf	14
2.2. Blutgerinnungsstörung	15
2.3. Prüfung verschiedener Antigen-Präparate in vivo	15
2.4. Serologie	16
2.4.1. Indirekte Immunfluoreszenz	16
2.4.2. Ein Vergleich zwischen IIF, IEOP und ELISA zum Nachweis spezifischer Serumantikörper gegen das ASP-Virus	17
2.5. Virusträger	18
2.6. Sektion	19
IV. DISKUSSION	33
1. Eigenschaften der Antigen-Präparate	33
2. Wirksamkeit der Antigen-Präparate	33
2.1. Challenge (Infektion)	33
2.2. Krankheitsverlauf und Symptome	34
2.3. Vergleich zwischen den einzelnen Antigen-Präparaten	35
2.4. Sektionsbefunde	35
3. Serologie	36
3.1. Schutzwirkung	37
4. Viruspersistenz	37

V. ZUSAMMENFASSUNG	39
VI. LITERATURVERZEICHNIS	40
LEBENS LAUF	45
VERDANKUNGEN	46

Abkürzungen

ASP	Afrikanische Schweinepest
BGS	Blutgerinnungsstörung
BPL	Beta-Propiolacton
CV ₁ -Zellen	Affennieren-Zellmonolayer
DIF	Direkte Immunfluoreszenz
Ec	Erythrozyten
ELISA	Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
ES	Edelschweine
ESP	Klassische Viruspest der Schweine oder Europäische Schweinepest
EVI	Eidg. Vakzine-Institut
FA ink.	Freund'sches Adjuvans inkomplett
FAK	Freund'sches Adjuvans komplett
HAD	Hämadsorptionstest
HAD-Einheiten	Hämadsorbierende Einheiten
IEOP	Immuno-Elektroosmophorese
IIF	Indirekte Immunfluoreszenz
i.m.	intramuskulär
Lc	Leukozyten
Lck	Leukozytenkultur
OBG	1-O-1-octyl-beta-D-Glucopyranosid
PBS	<u>Phosphate Buffered Saline</u>
p.i.	post infectionem
VLS	Veredelte Landschweine

I. EINLEITUNG

1. Krankheit und Erreger

Die Afrikanische Schweinepest (ASP) ist eine hochkontagiöse, je nach Virusstamm tödlich verlaufende Infektionskrankheit der Schweine aller Altersklassen. Erreger ist ein zur Zeit noch nicht endgültig klassifiziertes Virus, welches laut Vinuela (persönliche Mitteilung, 14) teilweise die Genomstruktur des Vacciniavirus und andererseits die Proteine eines Iridovirus besitzt (17). Das DNA-Virus hat die Form eines Ikosaeders und besitzt eine lipidhaltige Hülle. Mit einem Durchmesser von 200 nm gehört es zu den grossen Viren, ist es doch 10mal grösser als der MKS-Erreger. Das ASP-Virus ist im pH-Bereich von 2,0 bis 13,4 stabil, was ihm erlaubt die Infektiosität in Fleischwaren über Monate zu bewahren, (z.B. 5 bis 6 Monate im Schinken). Zur Desinfektion eignen sich 2 %-ige Natronlauge sowie 2,5 %-iges Formalin (39).

2. Klinik und Pathologie

Die Virulenz einzelner ASP-Virusstämme ist sehr unterschiedlich, demzufolge kann die Infektion klinisch inapparent verlaufen, wie auch zu perakuten Todesfällen führen. Die experimentelle Infektion mit einem hochvirulenten Stamm geht bei Schweinen nach einer Inkubationszeit von 2 bis 5 Tagen (50) in eine klinisch manifeste Erkrankung über. Erste Zeichen sind hohes Fieber (42°C), Somnolenz und Fressunlust, gefolgt von Zirkulationsstörungen, die oft als blaue Verfärbung der Ohrspitzen, der Bauchunterflächen sowie der Schwänze sichtbar werden. Konstipation wird kurz vor dem Exitus häufig noch durch blutige Durchfälle abgelöst (54). Die Mortalität beträgt nahezu 100 %.

Die pathologisch-anatomischen Veränderungen gleichen denjenigen einer akuten Septikämie. Auffallend stark betroffen ist das Retikulo-Endotheliale-System, als vermutliche Hauptvermehrungsstätte der Viren (28, 57). Die Lymphknoten sind stark vergrößert und hämorrhagisch, die geschwollene, dunkel gefärbte Milz weist ein brüchiges mit Hämorrhagien durchsetztes Parenchym auf. Die Nieren können nebst petechialen Blutungen in seltenen Fällen auch Rindeninfarkte aufweisen. Somit ist die ASP im Felde nur sehr schwer von der klassischen Viruspest der Schweine (ESP) zu unterscheiden (20, 39).

3. Epidemiologie

Die Krankheit wurde anfangs dieses Jahrhunderts in Afrika (Kenya) von Montgomery zum erstenmal beobachtet und beschrieben. Damals erkrankten importierte europäische Hausschweine (29). Die Mortalität lag über 98 %. Es stellte sich heraus, dass die wildlebenden Warzenschweine (*Phacochoerus aethiopicus*) das Virus beherbergen ohne klinisch zu erkranken. Sie fungieren somit als Virusreservoir (9, 10). Die Zecke *Ornithodoros moubata porcinus* befällt als Ektoparasit sowohl Warzenschweine als auch Hausschweine. Beim Blutsaugen überträgt sie das Virus nicht nur von Warzenschwein auf Warzenschwein, sondern auch von Warzenschweinen auf Hausschweine (36, 37, 40).

Im Jahre 1957 trat die Seuche in Europa erstmals auf. Betroffen waren Schweine in der Nähe des Hafens von Lissabon, denen vermutlich ungekochte Küchenabfälle von Schiffen, die aus Afrika kamen, verfüttert worden waren. Der Infektionsherd konnte sofort getilgt werden. 1960 traten jedoch in Portugal wiederum Infektionen auf, von dort breitete sich die Seuche nach Spanien (1960) und später auch kurzfristig nach Frankreich (1964) aus.

Frankreich gilt heute als seuchenfrei, die Iberische Halbinsel hingegen ist seitdem endemisch verseucht. Im Jahre 1978 meldeten Malta, Sardinien, Brasilien und die Dominikanische Republik Neuausbrüche; 1979 wurde Haiti, 1980 Kuba von der Seuche heimgesucht. Dies war für Kuba nach 1971 der 2. Ausbruch. Kuba (1971) und Malta tilgten die Seuche durch Keulung der gesamten Schweinepopulation (55). Die wirtschaftliche Einbusse betrug für Malta schätzungsweise 70'000'000 US\$. Die letzten bedeutenden Neuausbrüche auf dem europäischen Kontinent wurden im Frühjahr 1983 aus Norditalien (31) und 1985 aus Belgien gemeldet (31). Die Seuchenherde wurden jedoch sofort getilgt.

Die schnelle Verbreitung der Seuche über ganze Erdteile hinweg ist in den meisten Fällen der Verfütterung ungekochter Küchenabfälle aus Schiffen und Flugzeugen an Schweine zuzuschreiben (20). Fleisch- und Tierhandel sowie Art der Haltung spielen nur bei der Erhaltung einer endemischen Seuchelage im Lande selber eine gewisse Rolle (16).

4. Virulenz

Es macht den Anschein, als hätte das ASP-Virus im Verlauf der Zeit an Virulenz eingebüsst. Betrug die Mortalität anfangs des Jahrhunderts in Kenya noch nahezu 100 %, so verringerte sie sich bei den Neuausbrüchen in den Jahren 1978/80 auf durchschnittliche 50 % (42). Auf Haiti sollen nur noch 3 % der Tiere gestorben sein (26, 27). Für diese Ausbrüche müssen ausschliesslich schwach virulente Stämme verantwortlich gemacht werden. Wir haben jedoch damit zu rechnen, dass plötzlich wieder vermehrt hochvirulente Stämme aktiv werden, was nach neuesten Meldungen aus Spanien und Portugal (De Castro, persönliche Mitteilung, 14) bereits der Fall zu sein scheint.

5. Diagnose und Bekämpfung

Schwerwiegende wirtschaftliche Schäden lassen sich nur dann vermeiden, wenn eine Seuche bei Ausbruch sofort richtig diagnostiziert und gezielt bekämpft werden kann. Da sich in der Anfangsphase die ASP von der klassischen Schweinepest (ESP) und anderen Infektionskrankheiten septikämischen Charakters klinisch kaum unterscheiden lässt, ist man auf die Labordiagnostik angewiesen.

Wird die Diagnose "ASP" gestellt, so ist auch heute noch das "Stamping out" die einzige wirksame Bekämpfungsmöglichkeit. Unter stamping out versteht man die unschädliche Beseitigung infizierter Tiere ohne Nutzung des Fleisches.

Nach der massiven Verbreitung der Seuche ausserhalb des afrikanischen Kontinents in den Jahren 1978/80 verstärkte sich der Ruf nach einer Vakzine. Für grosse Länder wie Brasilien ist es aus wirtschaftlichen (20) und sozialen Gründen kaum tragbar die Seuche allein durch "Stamping out" zu bekämpfen. Unter diesen Umständen wären solche Länder bereit, die Nachteile und Risiken, welche jede Vakzination mit sich bringt, einzugehen.

6. Immunisierung

Die Portugiesen versuchten in den 60er Jahren als erste eine Vakzine gegen die ASP zu entwickeln. Das Ergebnis war entmutigend. Nach der Applikation des attenuierten Lebendimpfstoffes starben ca. 20 % der 500'000 vakzinierten Schweine an den Spätfolgen der Vakzination (chronische Pneumonien und Perikarditiden). Die Impfung führte gleichzeitig im ganzen Lande zu unentdeckten Virusträgern (24, 25, 20, 23).

Auch die übliche Verabreichung von inaktiviertem Antigen vermochte die Schweine nicht vor der Infektion zu schützen (7, 51,

52). Ein intensives Studium des Immungeschehens nach Vakzination bzw. Infektion zeigte, dass Schweine wohl komplementbindende Antikörper (52, 7), präzipitierende Antikörper (35) und ELISA-Antikörper (48, 49) bilden, aber die induzierten Antikörper waren nicht in der Lage, das Virus zu neutralisieren. Oft konnte man in Serumproben gleichzeitig hohe Antikörpertiter teilweise mit Hypergammaglobulinämie (34), freie infektiöse Viruspartikel und Immunkomplexe nachweisen. Auch Forschergruppen in Madrid und Plum Island (13) haben versucht, eine attenuierte bzw. temperatursensitive Lebendvakzine zu entwickeln. Es gelang ihnen jedoch lediglich, einen geringgradigen Schutz gegen homologe Virusstämme zu induzieren, wobei die überlebenden Tiere Virusträger wurden.

7. Ziel der Arbeit

Erstes Ziel war es, die am Institut vorhandenen labordiagnostischen Methoden zu erweitern und zu standardisieren. Zweitens wurde versucht ein wirksames Antigen-Präparat zu entwickeln, welches weder chronische Impfschäden noch versteckte Virusträger hervorruft. Demzufolge arbeiteten wir ausschliesslich mit inaktivierten Antigen-Präparaten, die zur Verstärkung der Immunantwort mit Adjuvantien versetzt wurden.

Heute beruht unsere Diagnostik sowohl auf dem direkten Virusnachweis mittels direkter Immunfluoreszenz (DIF) und Hämadsorptions-Test (HAD), als auch auf der Serologie: indirekte Immunfluoreszenz (IIF), Immuno-Elektrosmophorese (IEOP) und Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA).

Das entwickelte inaktivierte Antigen-Präparat vermochte bei allen Schweinen die Antikörperbildung zu induzieren und schützte einen Grossteil der Tiere nach der Infektion vor dem Tode. Alle überlebenden Tiere waren jedoch Virusträger.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Tiermaterial und Haltung

Für unsere Versuchsreihe wurden gesunde, veredelte Landschweine (VLS) und Edelschweine (ES) aus verschiedenen Schweinebetrieben verwendet. Zu Beginn der Versuche wogen die Ferkel durchschnittlich 20 kg und waren ca. 8 bis 10 Wochen alt.

Die Tiere wurden gruppenweise in getrennten Boxen gehalten und einmal täglich, morgens, mit Alleinfutter in suppiger Form gefüttert (Futter : Wasser = 1:3). Daneben stand ihnen Wasser ad libitum zu Verfügung.

Rektale Temperaturmessungen und Blutentnahmen aus der Vena jugularis (2) erfolgten vor der Fütterung während der ganzen Versuchsreihe in regelmässigen Abständen. Gewichtskontrollen wurden wöchentlich durchgeführt. Nach Ablauf des jeweiligen Versuches wurden die überlebenden Ferkel euthanasiert. Post mortem wurden alle Versuchstiere seziiert.

2. Schweineleukozytenkultur (Lck)

Aus heparinisiertem (Liquemine Roche /1'000 IE Heparin/ml) Schweineblut wurden Plasma und buffy coat gewonnen. Um die Leukozyten (Lc) zu kultivieren gab man der Plasma - buffy coat - Fraktion die 3-fache Menge porcines Serum (North American Biologicals, Miami, Florida 33169) und die 4-fache Menge an Medium 199 (M 199 Earle's Base) plus Antibiotika (pro Liter Medium: 0,05 g Neomycin, 100'000 IE-Penicillin G, 0,1 g Streptomycin, 0,012 g Polymycin) zu. Je 2 ml der hergestellten Medium-Lc-Suspension wurden in 20 ml Röhrchen gegeben. Im Brutschrank bei 37°C wuchsen nun die Makrophagen an den Wänden der flachge-

stellten Röhrchen (33). Am 3. Tag wurde das Isoliermedium durch das Erhaltungsmedium bestehend aus 50 % porcinem Serum und 50 % M 199 ersetzt. Die durchschnittliche Verwendbarkeit einer Lck für den direkten ASP-Virusnachweis betrug 3 Wochen.

3. Virus

Beim verwendeten afrikanischen Schweinepestvirus handelte es sich um den hochvirulenten Perpignan Stamm. Dieser ASP-Virusstamm 32/3832 Perpignan wurde im Jahre 1964 vom Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires d'Alfort (France) isoliert. Am Eidg. Vakzine-Institut (EVI) hatte man am 17. Mai 1967 eine I., am 6. Februar 1968 eine II. Schweinepassage durchgeführt, nach der das infizierte Tier am 12. Februar 1968 starb. Die bei -70°C in toto eingefrorene Milz, diente uns sowohl zur Herstellung der Antigen-Präparate als auch zur Infektion der Versuchstiere und Schweineleukozytenkulturen. Zur Infektion (Challenge) der Versuchstiere wurde stets 1 ml 1 % Milzsuspension per os verabreicht, dies entsprach 5×10^4 hämadsorbierenden Einheiten Virus (HAD-Einheiten). Die Lck wurden jeweils mit 0,2 ml der 1 % Milzsuspension infiziert (1×10^4 HAD-Einheiten).

4. Antigen-Präparate

4.1. Organ-, Erythrozyten-, und Leukozytensuspensionen

ASP Milz 68: Die 10%-ige Milzsuspension bestand aus dem Ueberstand nach Zentrifugation von 1g zerkleinerter Milz, suspendiert in 10 ml Isoliermedium (Earle's Minimum Essential Medium plus die doppelte Konzentration von Antibiotika, s. Abschnitt 2).

Die Milz stammte von einem Schwein, welches am 6.

Tag p.i. an ASP starb. Die Milzsuspension enthielt 5×10^6 HAD-Einheiten Virus/ml.

ASP Milz 83: Die Milzsuspension (hergestellt wie ASP Milz 68) stammte von einem Schwein, welches mit ASP Milz 68 infiziert wurde und am 11. Tag p.i. starb. Der Virusgehalt betrug 5×10^7 HAD-Einheiten/ml.

ASP Ec 84 : (Erythrozytensuspension)

Einem mit ASP Milz 68 infizierten Schwein wurde 5 Tage p.i. Blut genommen. Das Blut wurde mit Heparin versetzt. Die sedimentierten Ec wurden 2-mal mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und danach bei -70°C eingefroren. Für die Vakzination wurden die virushaltigen Ec in einer gleichen Menge NaCl resuspendiert. Die 50 % Ec-Suspension enthielt $2,5 \times 10^6$ HAD-Einheiten Virus/ml.

ASP Lck 84 : (Suspension von kultivierten Leukozyten)

Eine Lck wurde mit 0,2 ml ASP Milz 68 Suspension infiziert und am 5. Tag p.i. tiefgefroren. Die Suspension enthielt 5×10^7 HAD-Einheiten Virus/ml.

Placebos : Als Kontrollantigene bzw. Placebos dienten die Milzsuspensionen eines gesunden Schlachtschweines.

4.2. Inaktivierung

Die infizierten Milz- und Lck-Suspensionen wurden durch Zugabe von 1 % 1-O-1-octyl-beta-D-Glucopyranosid (OBG) bei Zimmertemperatur unter ständigem Schütteln mit dem Vortex während 30 Min. inaktiviert (4, eigene in vitro Versuche). Für die Inaktivierung der 50 % Ec-Suspension gab man 2 anstatt nur 1 % OBG dazu, ansonsten wurde genau gleich vorgegangen.

Milzsuspensionen wurden ebenfalls durch Zugabe von 1 ‰ Beta-Propiolacton (BPL) während 2 Std. bei Zimmertemperatur inaktiviert (51).

Bezugsquelle: OBG: SIGMA P.O.Box 14508 St. Louis, USA
BPL: Fluka AG, 9470 Buchs (SG), Schweiz

4.3. Adjuvantien

Als Adjuvantien dienten Freund'sches Adjuvans komplett (FAK), Freund'sches Adjuvans inkomplett (FA ink.) und Oel (Emulsion Placebo No. 1; 50 % mit Phosphat gepufferte physiologische NaCl-Lösung plus 50 % oelige Phase).

Bezugsquelle: FAK und FA ink.:

Difco - P.O.Box -1058 A, Detroit, USA
Oel: Rhône Mérieux, F-69342 Lyon

In einem 30 ml Zentrifugenröhrchen wurde den jeweiligen antigenhaltigen Suspensionen unmittelbar nach deren Inaktivierung das dazugehörige Adjuvans tropfenweise beigegeben. Adjuvans und Antigen wurden mit dem Mixer fortlaufend zu einer Emulsion verarbeitet. Um das Antigen-Präparat vor Erhitzung zu bewahren, war das Zentrifugenröhrchen während der Verarbeitung von einem Eiswasserbad umgeben. Das Mengenverhältnis zwischen Antigen und Adjuvans betrug im fertigen Antigen-Präparat 1:1.

4.4. Applikation

Die Antigen-Präparate wurden immer unmittelbar nach der Herstellung verwendet. Man injizierte zweimal jedem Schwein 2 ml des Antigen-Präparates tief in die Nackenmuskulatur in einem zeitlichen Abstand von jeweils 2 Wochen. Die Infektion der Schweine erfolgte 2 Wochen später. Bei der 8-fachen Vakzination

applizierte man 2 ml des Antigen-Präparates in 3 bis 4 tägigem Intervall alternierend in die Nacken-, bzw. Oberschenkelmuskulatur. Die Infektion erfolgte 3 Tage nach der letzten Immunisierung.

5. Serologie

Während der ganzen Versuchsdauer wurden die Ferkel regelmässig serologisch überprüft. Der Verlauf der Antikörpertiter wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz (IIF), Immunelektroosmophorese (IEOP) und Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) verfolgt.

5.1. Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)

Die IIF wurde nach der von Sanchez Botija et al. (44, 32, 45, 21) beschriebenen Methode durchgeführt. Der 24 Std alte Affennieren-Zellmonolayer (CV₁-Zellen) auf den Lab-Teks (Diethelm & Co. AG., Abt. Pharma, Eggbühlstrasse 14, 8052 Zürich) wurde mit dem zelladaptierten ASP-Virusstamm Lissabon 1960 infiziert, und nach weiteren 24 Std. mit Azeton fixiert. Seren und Konjugat wurden jeweils für 30 Min. auf den infizierten Monolayer gegeben. Die Ablesung erfolgte mit einem Auflicht-UV-Mikroskop (Leitz, Laborlux K, Typ 307-143.004/514 662; Ernst Leitz Wetzlar, GmbH, Germany).

5.2. Immunelektroosmophorese (IEOP)

Die IEOP wurde nach der von Pan et al. 1972 (35) beschriebenen Methode durchgeführt, mit einer zusätzlichen Coomassie Blue Brillant G-250 Färbung, die das Ablesen erleichterte (1).

5.3. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA wurde nach der von Sanchez-Vizcaino (48, 49) beschriebenen Methode durchgeführt. Das VP 73 Antigen erhielten wir freundlicherweise von Dr. M. Lombard, Rhône Mérieux, F-Lyon.

6. Virusisolation

6.1. In vitro Virusnachweis

In vitro erfolgte die routinemässige Virusisolation aus den Blutfraktionen und Organen auf 5 bis 20 Tage alten Lck nach dem von Malmquist beschriebenen Hämadsorptionstest (HAD-Test) (22, 41, 6).

6.1.1. Virusisolierung aus dem Serum

Das aus der Vena jugularis gewonnene Blut (2) wurde bei Zimmer-temperatur eine bis zwei Std. stehengelassen. Das Serum wurde abpipettiert und bei 800 g 10 Min. lang zentrifugiert. Zur Virusisolation infizierte man jede Lck mit 0,2 ml Serum.

6.1.2. Virusisolierung aus Erythrozyten (Ec) und Leukozyten (Lc)

Die Blutproben wurden zu diesem Zweck in heparinisierte Röhrchen aufgefangen. Nach der Sedimentation, 2 Std. bei 37°C in schiefgestellten Röhrchen, wurden buffy coat und Ec getrennt gewonnen. Beide Fraktionen wurden mit PBS gewaschen (2 x 10 Min. Zentrifugation bei 800 g). Nach einmaligem Einfrieren und Auftauen wurden die Lck mit 0,2 ml der Ec- bzw. Lc-Fraktion infiziert.

6.1.3. Virusisolierung aus Organen

Aus 0,2 ml einer 10%-igen Organsuspension von Milz, Tonsillen

oder Lymphknoten wurde der HAD-Test nach Malmquist (22) durchgeführt.

6.2. In vivo Virusnachweis

Die Virusisolation in vivo erfolgte mit Ferkeln, die mit vermutlichen Virusträgern zusammen in einer Boxe gehalten wurden, oder denen man infektiöses Material, meistens Blut, i.m. und/oder per os verabreichte.

Die Versuchsanordnung war die folgende:

In 2 getrennten Boxen wurden vier bzw. fünf klinisch gesunde, ehemals an ASP erkrankte Ferkel gehalten (Spendertiere). In die 4er-Boxe wurden am 42. Tag p.i. für die nächsten 65 Tage 2 für ASP empfängliche Ferkel als Kontakttiere gegeben.

Zusätzlich wurden jedem Ferkel (Spendertier) der 4er und 5er Boxe ein für ASP empfängliches Ferkel (Empfangstier) zugeteilt, die wiederum in zwei getrennten Boxen gehalten wurden. Am 49. Tag p.i. wurde den Spendertieren je 10 ml Blut genommen. Mit dem heparinisierten Blut inokulierte man je eine Lck und das zugeteilte Empfängertier. Die Inokulationsdosis pro Ferkel betrug 2,5 ml Blut i.m. und 2,5 ml Blut per os. Erkrankten die Empfängertiere nicht, so wurde 10 Tage später die Inokulation wiederholt.

III. RESULTATE

1. Eigenschaften der hergestellten Antigen-Präparate

1.1. Virusfreiheit der Antigen-Präparate

Tab. 1 zeigt, dass Glykopyranosid ASP-Virus inaktivierte. Gab man einer virushaltigen Organsuspension 0,25 % OBG während 30 Min. hinzu, so konnte noch infektiöses Virus isoliert werden, was nach einer Zugabe von 0,5 % OBG nicht mehr möglich war. Bei einer 50 %-igen virushaltigen Erythrozytensuspension hingegen benötigte man 1 % OBG zur vollständigen Inaktivierung. Die Zugabe von 1^o/oo BPL während 2 Stunden genügte ebenfalls zur Inaktivierung der Viren in einer Organsuspension.

Alle im Versuch verwendeten Antigen-Präparate wurden auf ihre Festinfektiosität geprüft und erwiesen sich sowohl "in vitro" als auch "in vivo" nicht als infektiös.

1.2. Verträglichkeit der Antigen-Präparate

Die Applikation der Antigen-Präparate führte im allgemeinen bei den Schweinen weder zu erhöhter Temperatur noch zu lokalen Schwellungen, obwohl in seltenen Fällen eine geringe Temperaturerhöhung sich einzustellen schien (Abb. 1). Das Allgemeinbefinden blieb stets gut, obwohl bei der Sektion an den Injektionsstellen der Antigen-Präparate, die komplettes Freund'sches Adjuvans enthielten, vereinzelt Abszesse gefunden wurden. Einzig die mehrfache Applikation von komplettem Freund'schen Adjuvans führte zu Unverträglichkeitsreaktionen. Einen Tag nach der 5. Vakzination erhöhte sich die durchschnittliche Temperatur dieser Ferkelgruppe um 0,5°C, ein Tier zeigte 41°C Fieber. Die Antigenpräparate waren somit gut verträglich.

2. Immunisierungsversuche und artifizielle Infektionen

2.1. Klinischer Krankheitsverlauf

Drei bis fünf Tage nach der Infektion erkrankten sowohl immunisierte als auch nicht immunisierte Ferkel an ASP. Die Krankheitsdauer schwankte zwischen 10 und 15 Tagen.

In Tab. 2 sind die klinischen Symptome zusammengestellt. Zwischen den Impflingen und den Kontrolltieren bestanden in dieser Hinsicht keine Unterschiede. Zuerst traten Fieber und Schläfrigkeit auf. Abb. 1 zeigt einen markanten Temperaturanstieg ab dem 3. Tag p.i., am 5. bis 6. Tag wurden Höchstwerte von 42°C erreicht. Die erhöhte Temperatur hielt 5 bis 10 Tage an. Gleichzeitig wurden auch zyanotische Veränderungen an den Ohrrändern und Schwänzen sichtbar. In der 1. Krankheitswoche war die Konsistenz des Kotes meistens hart, die Farbe dunkelbraun bis schwarz. Kurz vor Exitus trat blutiger Durchfall auf. Abgänge registrierten wir ab dem 7. Tag p.i. und es zeigte sich eine deutliche Häufung der Todesfälle in der 2. Woche p.i. (Abb. 2). Als letztes starb ein Kontrolltier am 21. Tag. p.i. Bei den mit verschiedenen Antigenpräparaten immunisierten Tieren überlebten 50 %, bei den Kontrolltieren jedoch nur 14 %.

In den 3 Wochen vor der Infektion betrug der durchschnittliche tägliche Gewichtszuwachs der 92 Ferkel 0,342 kg/Tag. Während der Fieberphase nahmen die Ferkel praktisch nur noch Flüssigkeit zu sich. Der Tageszuwachs der 35 Überlebenden vakzinierten Ferkel sank in dieser Zeit auf 0,26 kg/Tag. Die Vakzination vermochte lediglich die Ueberlebensrate der Ferkel zu erhöhen, schützte sie jedoch nicht vor der klinischen Erkrankung, die eine starke Wachstumsverzögerung mit sich brachte.

2.2. Blutgerinnungsstörung (BGS)

Bei 13 der 22 Kontrolltiere (60 %) sowie bei 42 der 70 vakzi-
nierten Tiere (60 %) war während der Virämiephase die Blutgerin-
nung gestört. Alle 13 Kontrollen mit BGS überlebten die Infek-
tion nicht. Von den 42 vakzinierten Schweinen mit einer BGS
während weniger als 3 Tagen starben 50 %, bei längerdauernder
BGS verendeten 80 %, im Durchschnitt 57 % (Tab. 3). Wiesen die
Tiere keine BGS auf, betrug die Mortalität bei geimpften ledig-
lich 39 %, bei ungeimpften jedoch immer noch 66 %. Tiere mit BGS
zeigten anlässlich der Blutentnahme ein verlängertes Nachbluten
an der Stichstelle. Häufig bildeten sich subkutan und/oder intra-
muskulär Hämatome, die zu lebensbedrohlichen Atmungsbeschwerden
führen konnten. Im Reagenzglas koagulierte das Blut sofort zu
einem Gel. Die Erythrozyten konnten nicht vom Serum getrennt
werden, sodass sich aus 10 ml Blut nur einige Tropfen Serum
gewinnen liessen.

2.3. Prüfung verschiedener Antigen-Präparate in vivo

In Tab. 4 sind die Ergebnisse mit den geprüften Antigen-Präpa-
raten zusammengestellt.

Es zeigte sich, dass inaktiviertes Milzantigen auch ohne Adju-
vans einen gewissen Schutz vermittelte, 5 von 12 Tieren über-
lebten (Gruppe 1 und 5). Mit der Zugabe von Freund Adjuvans
Komplett (FAK) konnte die Schutzrate deutlich verbessert werden.
13 von 20 Schweinen überlebten die Infektion (Gruppe 3). Hinge-
gen vermochte eine achtmalige Antigengabe die Schutzrate nicht
zu verbessern (Gruppe 5 und 6). Ebenso konnte mit einem gewöhn-
lichen Oeladjuvans nur ein geringer Schutz erzielt werden (Grup-
pe 2). Auch die Inaktivierung des Milzantigens mit BPL und nach-
folgender Behandlung mit OBG ergab keinen besseren Schutzeffekt

(Gruppe 4). Hingegen wurde mit Antigen aus Erythrozyten von ASP-infizierten Schweinen eine ähnliche Schutzrate erzielt wie mit Milzantigen (Gruppe 8). Zellkulturantigen aus Makrophagen ergab nach 2-facher Vakzination einen 100 %igen Schutz (Gruppe 9). Wurden die Schweine nicht mit ASP-Antigen immunisiert, so überlebten sie nur ausnahmsweise die Infektion, 3 von 22 Tieren (Gruppen 10-14).

2.4. Serologie

2.4.1. Indirekte Immunfluoreszenz

Tab. 5 zeigt das zeitliche Auftreten von IIF-Antikörpern nach der zweimaligen Applikation verschiedener Antigen-Präparate, sowie nach der Infektion.

Am 10. Tag nach der 2. Vakzination mit ASP-Milz 68 ohne Adjuvans waren alle 6 Schweine seronegativ. Hingegen hatten zur Zeit der Testinfektion 42 von 51 Tieren, welche mit adjuvanshaltigen Antigen-Präparaten vakziniert worden waren, serokonvertiert. Nur Antigen-Präparate plus FAK führten bei ca. 20 % der Tiere schon nach der 1. Vakzination zur Bildung nachweisbarer Mengen von Antikörpern im Serum.

Am 4. Tag p.i. wies noch kein Kontrolltier Antikörper im Serum auf, am 11. Tag p.i. hatte jedoch bereits die Hälfte serokonvertiert. Am 20. Tag p.i. waren bei vakzinierten wie auch bei überlebenden nichtvakzinierten Schweinen ausnahmslos mittels Immunfluoreszenz Antikörper im Serum nachweisbar.

Zur Zeit der experimentellen Infektion waren 54 der 70 zwei und acht mal vakzinierten Tiere seropositiv, 16 noch seronegativ. Sowohl seropositive wie seronegative Ferkel starben im gleichen Verhältnis an den Folgen der ASP-Infektion (25/54 resp. 9/16).

Von den 34 vakzinierten Ferkeln, welche an den Folgen der ASP-Infektion starben, waren 33 zum Zeitpunkt des Todes seropositiv. Bei den nicht vakzinierten waren 8 von 19 seropositiv.

Der Antikörpertiterverlauf der verschiedenen Tiergruppen nach Infektion ist in Abb. 3 dargestellt. Die Kurven verliefen bis zum Zeitpunkt der Infektion flach. Die 2. Vakzination führte zu keinem markanten Anstieg des Titors. Zwischen dem 4. und 11. Tag p.i. stiegen die Antikörpertiter der vakzinierten Tiere steil an (Boostereffekt), wobei Titerwerte über 1:1280 erreicht wurden. Bei der Kontrollgruppe begann der Titeranstieg mit einer Verzögerung von ca. 4 Tagen, wobei der Mediantiter niedriger blieb als bei den vakzinierten Tieren.

2.4.2. Ein Vergleich zwischen IIF, IEOP und ELISA zum Nachweis spezifischer Serumantikörper gegen die ASP

Die drei Antikörpernachweismethoden sind hochspezifisch. Bei der Untersuchung von 240 Seren lieferte die IIF die zuverlässigsten Ergebnisse. 0,5 % der IEOP- und 1 % der ELISA-Werte erwiesen sich im Vergleich zu IIF als falsch negativ, 0,5 % der ELISA-Werte waren zusätzlich falsch positiv.

In der Sensitivität unterschieden sich die 3 Methoden deutlich. Die IIF war die sensitivste, die IEOP die am wenigsten sensitive Methode. Die Mehrheit der Seren durfte man mittels IEOP erst als positiv bezeichnen, als sie bereits einen IIF-Antikörpertiter von 1:80 und mehr aufwiesen.

Tab. 6 zeigt, dass nach 2 Vakzinationen mittels IIF 25 von 30, mittels ELISA 17 von 30 und mittels IEOP 1 von 30 Seren als positiv erkannt wurden. 3 Wochen p.i. konnte man bei allen Seren mit IIF und IEOP und bei 16 von 17 mit dem ELISA Antikörper

gegen die ASP nachweisen.

Bei den Kontrollen war 1 Ferkel bereits am 4. Tag p.i. im ELISA seropositiv. Am 11. Tag p.i. zeigten alle Kontrolltiere in der IIF Antikörper, während nur bei 2/3 der Kontrollferkel Antikörper mittels ELISA und IEOP nachweisbar waren. Am 21. Tag p.i. wiesen alle überlebenden Kontrolltiere Antikörper auf.

2.5. Virusträger

Bei jedem geimpften und nicht geimpften Ferkel fand p.i. eine Virusvermehrung statt. Bereits am 3. Tag p.i. konnte aus 3 von 92 Blutproben ASP-Virus isoliert werden. Abb. 4 zeigt, dass zwischen dem 4. und 11. Tag p.i. mehr als die Hälfte aller Ferkel eine Virämie aufwiesen, am 8. Tag p.i. waren es sogar mehr als 85 % der vakzinierten und 95 % der Kontrolltiere. In dieser Zeitspanne gelang der Virusnachweis mit dem HAD-Test aus dem Serum jedes Schweines mindestens einmal. Am 21. Tag p.i. konnten wir nur noch bei einem der 35 überlebenden vakzinierten Ferkel Virus aus dem Serum isolieren, aber bei keinem der 3 Kontrolltiere.

Die überlebenden Ferkel blieben potentiell Virusträger, ohne jedoch bei Kontakt andere Tiere anzustecken (siehe Versuchsanordnung II 6.2.). Am 49. Tag nach experimenteller Infektion konnte in Blutproben von zwei der neun klinisch gesunden Schweine indirekt ASP Virus in vivo nachgewiesen werden. Die zwei erkrankten Tiere, sowie ihre drei Gruppengefährten wurden bei Auftreten der klinischen Symptome sofort eliminiert. Am 58. Tag p.i. wurden die bleibenden 4 Empfängertiere nochmals mit Blut infiziert: ein Ferkel erkrankte. Die 3 Ferkel, welche mit Blut der 3 Virusträger infiziert wurden, erkrankten zwischen dem 4. und 5. Tag nach der Blutübertragung akut an ASP. Nur bei

einer dieser 3 Blutproben, die beim Schwein zum Ausbruch der Krankheit führten, konnte man in vitro (HAD-Test) ebenfalls Virus nachweisen.

Die Virusisolutionsrate aus dem Blut bei 9 klinisch gesunden Schweinen 70 bis 107 Tage p.i. ist in Tab. 7 dargestellt. Die getrennte Durchführung des HAD-Testes mit der Erythrozyten-Fraktion und der Leukozyten-Fraktion aus derselben Blutprobe zeigte, dass in den Leukozyten häufiger Virus anzutreffen war als in den Erythrozyten. Allerdings schienen unsere persistent infizierten Tiere kein oder nur wenig Virus ausgeschieden zu haben, denn vom 42. Tag bis zum 107. Tag p.i. wurden zwei Kontakttiere in einer Boxe gehalten, ohne dass diese erkrankt wären oder serokonvertiert hätten.

Aus Serum und Organen aller Versuchstiere wurde beim Tod, bzw. bei der Schlachtung Virus zu isolieren versucht (HAD-Test). Die Ergebnisse sind in Tab. 8 zusammengefasst. 33 der 35 gestorbenen vakzinierten Tiere und 18 der 19 gestorbenen Kontrolltiere verendeten in der virämischen Phase. Praktisch in allen dabei untersuchten Organsuspensionen konnte man Virus finden, am häufigsten in der Milz. Anlässlich der Schlachtung der überlebenden Tiere in der 4. Woche p.i. war die Virusisolation aus dem Serum aller Tiere negativ. Die Hälfte der untersuchten Organe der vakzinierten Tiere war jedoch noch virushaltig; dies war bei der Schlachtung in der 15. Woche p.i. nicht mehr der Fall. Bei der Schlachtung der 3 überlebenden Kontrolltiere konnte nie Virus, weder aus dem Serum, noch aus den Organsuspensionen isoliert werden.

2.6. Sektion

Unterschiede zwischen vakzinierten und nicht vakzinierten

Schweinen in bezug auf pathologische Veränderungen, waren keine festzustellen. Auffallend war ein stark verändertes lymphoretikuläres System. Mandibular- und Leberlymphknoten erreichten nicht selten Baumnussgrösse. Alle Darmlymphknoten waren dunkelbraun bis schwarz, dadurch wurden sogar die im Fett liegenden Lymphknoten des Kolonkegels deutlich sichtbar. Die mit Blut gestaute Milz war brüchig und um das 2 bis 3-fache vergrössert. Auch die Nieren wurden häufig in Mitleidenschaft gezogen. Petechiale Blutungen der Rinde sah man bei ca. 40 % der Tiere, wobei immer beide Nieren betroffen waren. An der Lunge liessen sich gelegentlich Entzündungen der Spitzenlappen feststellen, ganz selten fanden sich Pleuritiden und lokale Nekrosen. Vereinzelt stiess man auf petechiale Blutungen des Herzmuskels. In der Brust- und Bauchhöhle war regelmässig bis zu 1 Liter seröse Flüssigkeit vorhanden.

Starb ein Tier innert der ersten 10 Tage p.i., so war meistens nur das lymphoretikuläre System sichtbar geschädigt.

Bei der Schlachtung der überlebenden Schweine konnten keine Veränderungen festgestellt werden, die auf eine ASP-Infektion zurückzuführen waren.

Abb. 1: Verlauf der Körpertemperatur (Mittelwerte) bei vakzinierten (ASP Milz 68) Tieren (Δ — Δ) sowie bei nicht geimpften Schweinen ($\circ$ — $\circ$) nach Infektion.

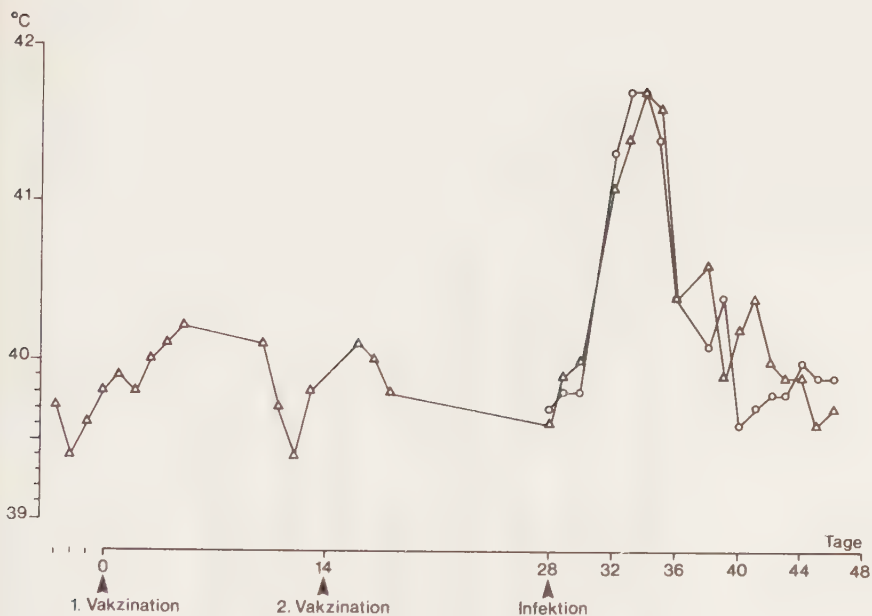


Abb. 2: Ueberlebensrate (%) von 70 vakzinierten und 22 nicht vakzinierten Ferkeln nach Infektion
■ vakzinierte Ferkel ▨ nicht vakzinierte Ferkel

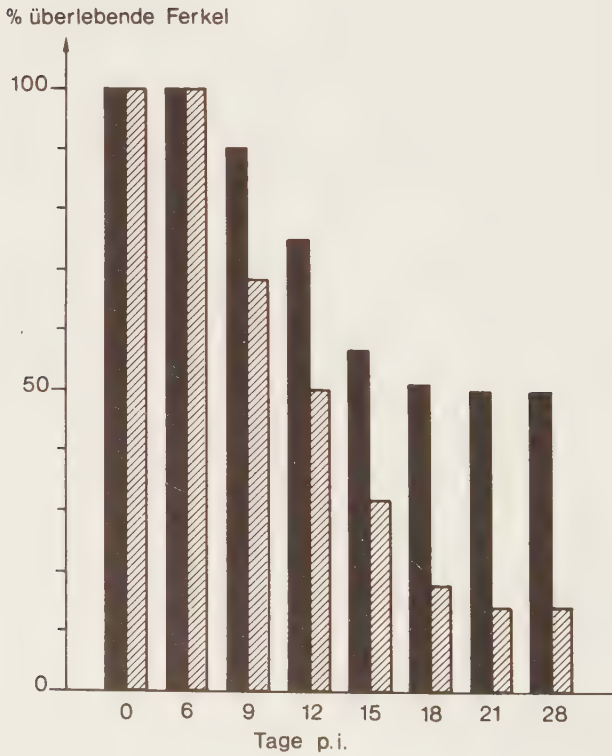
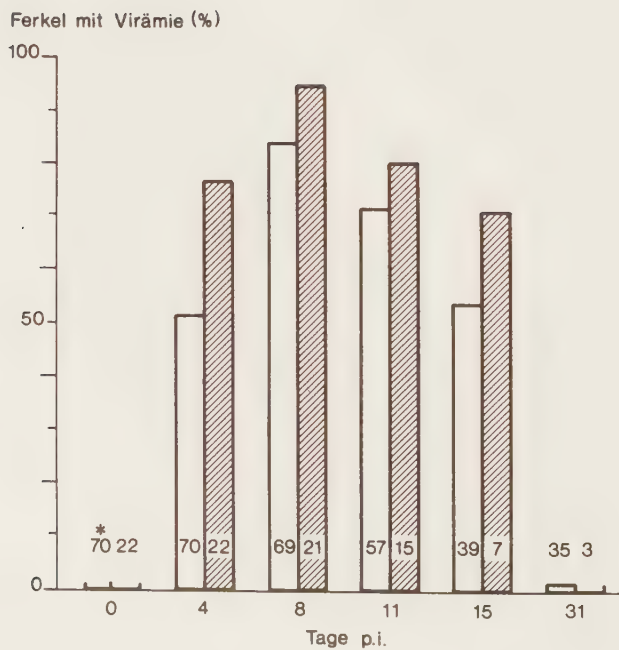


Abb. 3: Medianwerte der mittels IIF ermittelten Antikörpertiter bei vakzinierten und nicht geimpften Tieren nach Infektion. Vakzination mit ASP Ec 84 (●—●), mit ASP Lck 84 (○—○), und mit ASP Milz 68 (△—△). Nicht vakzinierte Kontrollgruppe (□—□). Die 1. Vakzination wurde 28 Tage und die 2. Vakzination 14 Tage vor Infektion vorgenommen. Es wurden 6 Tiere pro Gruppe eingesetzt.



Abb. 4: Virämie nach Infektion mit ASP-Virus bei vakzinierten (□) und nicht vakzinierten (▨) Ferkeln. *=Zahl der untersuchten Ferkel pro Zeiteinheit.



Tab. 1: Inaktivierung von ASP-Virus-Suspensionen mit verschiedenen Konzentrationen von Glykopyranosid bei Zimmertemperatur während 30 Minuten.

ASP-Virus-Suspension	G l y k o p y r a n o s i d k o n z .			
	0,25 %	0,5 %	1 %	2 %
ASP Milz 68	+	0	0	0
ASP Milz 83	+	0	0	0
ASP Lck 84	+	0	0	0
ASP Ec 84	+	+	0	0

+ Virus nachgewiesen mit HAD-Test

0 Kein Virus nachgewiesen mit HAD-Test

Tab. 2: Klinisch manifeste Symptome nach experimenteller ASP-Infektion.

S y m p t o m e	Häufigkeit
Körpertemperatur über 41°C	+++
Verminderte Fresslust	+++
Schläfrigkeit / Apathie	+++
Zyanotische Ohrenspitzen bzw. Ränder	++
" Schwänze	++
" Oberschenkel	+
" Rüsselscheibe	+
Zyanotischer Unterbauch	+
Verstopfung --➡ harter dunkler Kot	++
Durchfall --➡ wässrig, blutig	++
Erhöhte Atemfrequenz	+
Nasenausfluss (serös-blutig)	+
Schwankender Gang	+
Anämie	+

Tab. 3: Zusammenhang zwischen Blutgerinnungsstörung (BGS) und Letalität (in %) bei vakzinierten und nicht vakzinierten Schweinen.

BGS		keine BGS	
Kontrolltiere	vakzinierte Tiere	Kontrolltiere	vakzinierte Tiere
100 %	57 %	66 %	39 %

Tab. 4: Schutzwirkung von ASP-Antigenpräparaten.

Versuchs-Gruppe No.	Antigen-Präparate	Inaktivie-rungsmittel	Adjuvans	Anzahl Impfungen	Anzahl Ferkel	Anzahl über-lebende Ferkel
1	ASP Milz 68	OBG	-	2	6	3 (50 %)
2	ASP Milz 68	OBG	Oel	2	8	2 (25 %)
3	ASP Milz 68	OBG	FAK	2	20	13 (65 %)
4	ASP Milz 68	BPL + OBG	FAK	2	6	3 (50 %)
5	ASP Milz 68	OBG	-	8	6	2 (33 %)
6	ASP Milz 68	OBG	FAK*	8	6	2 (33 %)
7	ASP Milz 83	OBG	FAK	2	6	1 (15 %)
8	ASP Ec 84	OBG	FAK	2	6	4 (66 %)
9	ASP Lck 84	OBG	FAK	2	6**	5 (100%)
10	-	-	-		14	2
11	-	OBG	Oel	2	2	1
12	-	OBG	FAK	2	2	0 (13 %)
13	Kontrollmilz	OBG	Oel	2	2	0
14	Kontrollmilz	OBG	FAK	2	2	0

* Nach der 5. Applikation wurde FAK durch FA ink. ersetzt

** Ein Ferkel starb bei der Blutentnahme

Tab. 5: Zeitliches Auftreten von Antikörpern im Serum nach Applikation verschiedener Antigen-Präparate (AG-Präp.) sowie nach Infektion. Die Antikörper wurden mittels IIF nachgewiesen.

AG-Präp.	Zeit	10. Tag nach 1. Vakz.	10. Tag nach 2. Vakz.	4. Tag p. Inf.	11. Tag p. Inf.	20. Tag p. Inf.
Placebo		0/22	0/22	0/22	11/21	4/4
ohne Adjuvans		0/6	0/6	0/6	4/4	3/3
mit Oel		0/8	6/8	7/7	5/5	2/2
mit FAK		9/44	36/43	36/41	39/40	26/26

Zähler: Anzahl Tiere mit Antikörper

Nenner: Anzahl Tiere pro Gruppe

Tab. 6: Vergleich zwischen IIF, IEOP und ELISA als Nachweismethoden für Antikörper gegen das ASP-Virus.

Zeitpunkt	Vakzinierte Tiere			Kontrolltiere		
	IIF	ELISA	IEOP	IIF	ELISA	IEOP
1. Tag vor 1. Vakz.	0/30	0/30	0/30	0/0	0/0	0/6
10. Tag nach 2. Vakz.	25/30	17/30	1/30	n.d.	n.d.	n.d.
4. Tag p.Inf.	27/30	18/30	6/30	0/6	1/6	0/6
8. Tag p.Inf.	29/29	25/29	20/29	1/6	1/6	1/6
11.Tag p.Inf.	27/27	25/27	26/27	6/6	4/6	4/6
21.Tag p.Inf.	17/17	16/17	17/17	2/2	2/2	2/2

Zähler = Anzahl Tiere mit Antikörper

Nenner = Anzahl untersuchter Tiere

Tab. 7: Virusisolation aus Blutproben von 9 klinisch gesunden Schweinen, (8 vakzinierte und 1 Kontrolltier) entnommen an 10 Stichtagen zwischen dem 70. und dem 107. Tag nach Infektion.

Schwein	Virusisolation gelungen aus	
	Ec - Fraktion	Lc - Fraktion
No. 2	84. und 87. Tag	87. und 91. Tag
No. 14	nie	91. Tag
No. 11	nie	77. und 91. Tag
No. 15	nie	77. Tag
No. 8, 21, 4, 23 und Kontrolle	nie	nie

Tab. 8: Virusisolation nach Infektion aus Serum und Organen von vakzinierten und nicht vakzinierten Schweinen zum Zeitpunkt des Exitus resp. der Schlachtung.

Zeitpunkt p. Inf.	Vakzinierte Schweine				Nicht vakzinierte Schweine			
	Se	Mi	Tn	Ln	Se	Mi	Tn	Ln
gestorben zwischen 7. und 21. Tag	33/35	31/35	26/35	30/35	18/19	18/19	18/19	18/19
geschlachtet in der 4. Woche	0/20	12/20	12/20	9/20	0/2	0/2	0/2	0/2
geschlachtet in der 15. Woche	0/8	0/8	0/8	0/8	0/1	0/1	0/1	0/1

Se = Serum; Mi = Milz; Tn = Tonsillen; Ln = Lymphknoten

Zähler = Anzahl der virushaltigen Seren bzw. Organe

Nenner = Anzahl untersuchter Schweine

IV. DISKUSSION

1. Eigenschaften der Antigen-Präparate

Antigen-Präparate sollten einerseits unschädlich und gut verträglich sein, andererseits die Zielspezies wirksam vor einer Infektion schützen. Bedingung dazu ist, dass bei der Inaktivierung des infektiösen Agens die immunogenen Eigenschaften erhalten bleiben. Mit der Verwendung des nicht ionischen Detergens OBG konnte dieses Ziel erreicht werden. Bei Versuchen mit andern klassischen Inaktivierungsmitteln (18) war jeweils auch die Immunogenität der Präparate verändert.

Zwei Ueberlegungen haben zur Verwendung eines hochvirulenten ASP-Stammes geführt, obwohl schwach virulente und Zellkultur adaptierte Virusstämme wesentlich einfacher zu vermehren sind. Erstens führt eventuell nicht inaktiviertes Virus in den Antigenpräparaten sofort nach Vakzination zur Erkrankung der Schweine, so dass eine Restinfektiosität rasch erkannt wird, und zweitens scheint ein hochvirulenter Virusstamm, propagiert im Schwein, über alle wichtigen immunogenen Determinaten zu verfügen. Um die Immunantwort maximal zu verstärken, haben wir in den meisten Fällen Freund'sches Adjuvans komplett den Antigen-Präparaten beigegeben. Da es sich bei unseren Untersuchungen um experimentelle Versuche und nicht um praxisgerechte Entwicklungen handelte, musste der Aspekt der Unbrauchbarkeit des verwendeten Adjuvans für die Praxis nicht in Betracht gezogen werden. Es ging lediglich darum, ein möglichst wirksames Präparat zu entwickeln.

2. Wirksamkeit der Antigen-Präparate

2.1. Challenge (Infektion)

Für die Infektion wählten wir den oralen Weg, als Weg der

natürlichen Infektion. Dazu benutzten wir stets den homologen Virusstamm; denn wie frühere Versuche zeigten, sind vakzinierter Ferkel, ja sogar solche, die eine Infektion mit einem bestimmten Virusstamm überlebten, gegenüber einem heterologen Virusstamm ungeschützt (4).

2.2. Krankheitsverlauf und Symptome

Es erkrankten alle Tiere. Klinisch war kein Unterschied zu sehen zwischen den einzelnen vakzinierter Gruppen und den Kontrollgruppen. Dauer der Krankheit, Zeitpunkt der Abgänge sowie die typischen Symptome (erhöhte Temperatur, Apathie, Somnolenz, zyanotische Hautpartien und Verstopfung gefolgt von Durchfall) waren bei allen Tieren gleich. Die Betrachtung eines einzelnen Tieres hätte uns trotzdem nicht immer erlaubt, klinisch die Diagnose ASP zu stellen. Dies deutet auf die Problematik hin, im Felde die Verdachtsdiagnose ASP zu stellen, vor allem wenn bei Neuausbrüchen Virulenz und Mortalität gering sein sollten. Eben- sowenig war es möglich, anhand des klinischen Bildes während des Krankheitsverlaufes vorausszusagen, welches Tier die Infektion überleben würde und welches nicht. Hingegen waren die während der Fieberphase auftretenden Blutgerinnungsstörungen (BGS) (12) ein guter Parameter für einen infausten Ausgang der Krankheit. Wiesen Kontrolltiere eine BGS auf, so kam es in jedem Fall zum Exitus. Die überlebenden Kontrollen zeigten dagegen nie eine EGS. Auch 50 % der geimpften Schweine mit BGS starben. Dauerten die BGS mehr als 3 Tage, verendeten sogar 80 % der vakzinierter Schweine. Es bestand auch eine direkte Beziehung einerseits zwischen der Ansammlung seröser Flüssigkeit in der Bauch- und Brusthöhle, den petechialen Blutungen der Nierenrinde und der Darmmukosa, die anlässlich der Sektion beobachtet wurden und der BGS andererseits.

2.3. Vergleich zwischen den einzelnen Antigen-Präparaten

Es ist uns gelungen mit inaktivierten Antigen-Präparaten Schweine gegen eine homologe ASP-Virusinfektion zu schützen. Es überlebten je nach verabreichtem Präparat zwischen 25 und 100 % der Tiere die Infektion, hingegen starben 19 der 22 infizierten Kontrolltiere. Auf eine statistische Auswertung der Ergebnisse wurde wegen der relativ kleinen Tierzahl pro Gruppe bewusst verzichtet.

Das ASP Milz 68 Antigen bewirkte bei genau gleicher Präparation und Applikation einen bedeutend besseren Schutz als das ASP Milz 83 Antigen. Obwohl das Milz 83 Antigen 10mal mehr Viruspartikel vor Inaktivierung enthielt, starben 5 der 6 vakzinieren Tiere p.i. Von den mit Milz 68 Antigen vakzinieren, starben lediglich 35 % p.i. Nebst dem Virusgehalt unterschieden sich die beiden Präparate dadurch, dass das Milz 68 Antigen von einem Schwein stammte, welches am 6. Tag p.i. starb, das Milz 83 Antigen von einem, welches am 11. Tag p.i. starb. Diese Unterschiede lassen vermuten, dass nicht allein Virusproteine, sondern auch virusinduzierte Substanzen für den Schutz gegen die ASP eine Rolle spielen können. Diese Hypothese wird aber teilweise entkräftet durch den unerwartet guten Schutz des Ec-84 Antigens, bei dessen Präparation eventuelle virusinduzierte Substanzen mit grösster Wahrscheinlichkeit gewegewaschen wurden. Erstaunlicherweise schützte das Lck 84 Antigen alle Schweine vor dem Tode. Neben den viralen Immunogenen sind dabei wahrscheinlich andere für den Schutz verantwortliche Substanzen von den Makrophagen produziert worden.

2.4. Sektionsbefunde

Bei der Sektion (50) konnten in Bezug auf makroskopische Ver-

änderungen geimpfte Ferkel nicht von Kontrolltieren unterschieden werden. Um die ganze mögliche Palette der krankheitsbedingten Veränderungen zu sehen, mussten mehrere Ferkel seziiert werden. Zu berücksichtigen war ebenfalls der Zeitpunkt des Todes bzw. der Schlachtung p.i. Vor allem Veränderungen der Lunge bzw. des Brustfelles, sowie am Herzen und Herzbeutel traten erst nach längerer Krankheitsdauer auf, was von Hess, W.R. und Moulton, J.E. ebenfalls beobachtet wurde (20, 30).

Bekanntlich variieren die Sektionsbefunde ebenfalls stark je nach ASP-Virusstamm, und lassen sich oft kaum von den durch die ESP hervorgerufenen Veränderungen unterscheiden (20). Nur die Virusisolation im Labor ermöglicht mit Sicherheit eine Diagnosestellung. Als Virusisolationsmaterial eignen sich Milz und Retropharyngeallymphknoten am besten.

3. Serologie

Als Referenzmethode für den Nachweis spezifischer Antikörper empfehlen Sanchez Botija et al. (45) die IIF. Die serologische Auswertung unserer Versuche bestätigte ebenfalls die hohe Spezifität und Sensitivität dieser Methode. Sie ist dem ELISA und der IEOP deutlich überlegen. Für die Ueberwachung einer Seuchelage sowie für Massenuntersuchungen genügt jedoch der weniger arbeitsintensive ELISA vollkommen, obwohl wir mit durchschnittlich 1 % Fehlresultaten rechnen müssen.

Mittels IIF, ELISA oder IEOP konnten wir zeigen, dass die Vakzinationen mit verschiedenen Antigenen die spezifische Antikörperbildung gegen die ASP anregten. Dies bestätigte uns ebenfalls der markante Antikörperanstieg (Boostereffekt) um den 4. Tag p.i. bei den vakzinierten Tieren. Ein solcher Effekt blieb bei den Kontrolltieren aus. 8 der 21 Kontrolltiere starben vor

der Serokonversion.

3.1. Schutzwirkung

Die zweimalige Vakzination induziert bei den Schweinen eine spezifische Antikörperbildung gegen die ASP. Diese Antikörper sind jedoch nicht ausschlaggebend für den Schutz gegenüber einer Infektion. Auch eine mehrmalige Vakzination vermag die Antikörpertiter nicht so zu stimulieren, dass eine erhöhte Schutzrate daraus resultieren würde (Tab. 4).

Dagegen sind Schweine, die eine ASP-Infektion mit einem bestimmten Virusstamm überlebten, gegenüber einer späteren Reinfektion mit dem gleichen Stamm geschützt (4).

Daraus kann geschlossen werden, dass spezifische Immunmechanismen für einen Schutz verantwortlich sind, die jedoch nur bei Infektion, nicht aber bei Vakzination ausgelöst werden können. Die nachgewiesenen Antikörper vermögen zudem das Virus nicht zu neutralisieren (5, 8). Virus und Antikörper finden sich deshalb häufig gleichzeitig im Serum. Auch Hypergammaglobulinämie (34) wird in der Literatur beschrieben. Wir haben keine entsprechenden Untersuchungen durchgeführt. Eine Interpretation all dieser Befunde ist heute nicht möglich. Zuvor wurden bei der Aleutenkrankheit (Parvovirus) der Nerze ähnliche Phänomene beschrieben, wobei die Läsionen als autoimmunbedingte Schäden erklärt wurden (19, 54). Solche Schäden konnte man jedoch bisher bei einer ASP-Infektion nicht beobachten (5).

4. Viruspersistenz

Nach Infektion von Ferkeln mit ASP-Virus konnten wir immer eine Virusvermehrung nachweisen. In der Folge blieben die Tiere, wie auch von anderen Autoren beschrieben (47, 11, 10) über Monate

Virusträger.

Unsere Antigen-Präparate vermochten die Schweine nicht vor einer Virusreplikation zu schützen. Immerhin war der Prozentsatz der Tiere mit Virämie bei den vakzinierten Schweinen niedriger (Abb. 4). Vereinzelt konnten wir bis Ende des 2. Monats p.i. Virus aus dem Blut isolieren, was auch von Wilkinson bestätigt wurde (57). Am längsten gelang die Virusisolation aus der Leukozytenfraktion (91. Tag p.i.). Wardley et al. (53, 28) beobachteten, dass sich die Viren während der Virämiephase vor allem in den Makrophagen vermehren. Es wäre denkbar, dass das Virus sogar zeitlebens in den Makrophagen oder Vorläufern dieser Zellen persistieren könnte.

Wir konnten die Befunde von Wilkinson (57, 32) bestätigen, wonach 1 Monat p.i. durchseuchte Schweine durch Kontakt allein keine gesunden Tiere mehr anzustecken vermögen. Ob jedoch in Stresssituationen Virus ausgeschieden würde, bleibt vorderhand noch ungeklärt. Es gelang uns jedenfalls noch am 58. Tag p.i. durch Blutübertragung von durchseuchten Ferkeln Kontrolltiere zu infizieren. Diese Tatsache widerspiegelt die Situation im Felde, wo blutsaugende Zecken als Vektor zwischen persistent infizierten und gesunden Schweinen eine Rolle spielen (37, 9). Ebenfalls keine Probleme bot die Virusisolation in vitro aus Milz, Tonsillen und Lymphknoten klinisch gesund geschlachteter Ferkel in der 4. Woche p.i. Diese Tatsache impliziert, alle ehemals an ASP erkrankten Tiere lebenslänglich als potentielle Virusträger zu betrachten. Für eine effiziente Seuchenbekämpfung kommt deshalb nach wie vor nur die Keulung aller Tiere in infizierten Bestände in Frage.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Mit verschiedenen inaktivierten Afrikanischen Schweinepestvirus Präparaten wurden Schweine immunisiert. Die Applikation erfolgte in zweiwöchigem Abstand. Je nach Präparat und zugefügtem Adjuvans konnten bis zu 100 % der Schweine geschützt werden. Eine Infektion und Replikation des Virus war jedoch nicht zu verhindern. Genesene Tiere blieben während mindestens 3 Monaten Virusträger. Obwohl Virus aus Serum und Organen der persistent infizierten Schweine isoliert wurde, erfolgte keine Infektion von Kontakttieren. Eine Uebertragung der Infektion auf gesunde Tiere gelang aber mit Blut persistent infizierter Tiere.

Die zwei- oder mehrmalige Immunisierung vermochte nur niedrige Antikörpertiter im Serum zu induzieren. Die Antikörper wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz (IIF), ELISA und Immunelektrosmophorese bestimmt. Die IIF erwies sich als zuverlässigste Methode für die Antikörperbestimmung. Der ELISA eignet sich vor allem für Massenuntersuchungen bei epidemiologischen Studien.

VI. Literaturverzeichnis

1. Axelsen, N.H., Kroll, J. and Week, B. (1973): A Manual of Quantitative Immunelectrophoresis. Methods and Applications. Scand. J. Immunol. 1, 15-35.
2. Bertschinger, H. und Geyer, H. (1975): Zur Blutentnahme und intravenösen Injektion beim Schwein. Schweiz. Arch. Tierheilk. 117, 701-711.
3. Bommeli, W.R., Kihm U., Lazarowicz, M. and Steck, F. (1980): Rapid detection of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus by micro enzyme linked immuno-sorbent assay. Proceedings of the second international symposium of veterinary laboratory diagnosticians, Lucerne (CH) II, 235-239.
4. Bommeli, W.R., Kihm, U. and Ehrensperger, F. (1981): Preliminary study on immunisation of pigs against African Swine Fever. CEC/FAO Expert Consultation on African Swine Fever Research, 217-223. Sardinia 23-25 September.
5. Commission of the European Communities (1975): Laboratory manual for research on classical and African Swine Fever, pp. 73-78, Madrid, 24-28 February.
6. Cowan, K.M. (1961): Immunological studies on ASFV. I. Elimination of the procomplementary activity of swine serum with formalin. J. Immunol. 86, 465-470.
7. De Boer, C.J., Hess, W.R., Dardiri, A.H. (1969): Studies to determine the presence of neutralizing antibody in sera and kidneys from swine recovered from ASF. Arch. ges. Virusforsch. 27, 44-54.
8. De Boer, C.J., Pan, I.C., Hess, W.R. (1972): Immunology of African Swine Fever. J. Am. Vet. Med. Ass. 160, (4), 528-532.
9. De Tray, D.E. (1957): ASF in wart hogs (*Phacochoerus aethiopicus*). J. Am. Vet. Med. Ass. 130, 537-540.
10. De Tray, D.E., Zophiro, D., Hay, D. (1961): The incidence of ASF in wart hogs in Kenya - a preliminary report. J. Am. Vet. Med. Ass. 138, 78-80.
11. De Tray, D.E. (1963): ASF. Advances Vet. Sci. 8, 299-333.
12. Edwards, J.F., Dodds, W.J., Slauson, D.O. (1984): Coagulation changes in African Swine Fever virus infection. Am. J. Vet. Res. 45, (1), 2412-2420.

13. FAO (1980): Report of the informal discussion on research needs to produce an African Swine Fever Vaccine. Held in Rome 12 to 14 December. WIN 5937. FAO/UN Rome, pp. 5.
14. FAO/EEC (1984): Expert Consultation on African Swine Fever and Classical Swine Fever. Held in Rome, 22-25 October.
15. FAO Reg. Off. Latin Amer. (1983): African Swine Fever. Exotic Diseases Newsletter 22.
16. FAO Reg. Off. Latin Amer. (1984): African Swine Fever. Exotic Diseases Newsletter 8, pp. 3.
17. Fenner, F. (1976): Classification and nomenclature of viruses. Intervirology 7, 1-115.
18. Formon, A.J., Wardley, R.C., Wilkinson, P.J. (1982): The immunological Response of Pigs and Guinea Pigs to Antigens of African Swine Fever Virus. Arch. Virol. 74, 91-100.
19. Henson, J.B., Leader, R.W. and Graham, J.R. (1961): Hypergammaglobulinemia in Mink. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 107, 919-920.
20. Hess, W.R. (1981): African Swine Fever: A Reassessment. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 25, 39-69.
21. Heuschele, W.P. and Hess, W.R. (1973): Diagnosis of ASF by immunofluorescence. Trop. Anim. Hlth Prod. 5, 181-186.
22. Malmquist, W.A. and Hay, D. (1960): HämadSORption and cytopathic effect produced by African Swine Fever Virus in Swine bone-marrow and buffy coat cultures. Am. J. Vet. Res. 21, 104-108.
23. Manso Ribeiro, J. (1962): Déclaration sur la vaccination contre la PPA à la XXX. Session Générale de l'O.I.E. Bull. Off. int. Epizoot. 58, 1031-1040.
24. Manso Ribeiro, J. (1962): Attenuation of ASFV by tissue culture. Bull. Off. int. Epizoot. 58, 1031-1040.
25. Manso Ribeiro, J., Nunes Petisca, J.L., Lopes Frazao, F. and Sobral, M. (1963): Vaccination against ASF. (Nat. Lab. of vet. Research Lisbon, Portugal 1962/1963 18 pp.) Bull. Off. int. Epizoot. 60, 921-937.
26. McDaniel, H.A. (1978): ASF. Proc. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. 21, 391-397.
27. Mebus, C.A., Dardiri, A.H. (1979): Additional characteristics of disease caused by the ASF virus isolated from Brasil and the Dominican Republic. Proc. U.S. Anim. Hlth. Ass. 83, 227-239.

28. Mebus, C.A., Gregg, D.A. (1984): Evaluation of in vivo macrophages phagocytosis in ASF infection. Consultation d'experts FAO/CEE sur la peste porcine africaine et la peste porcine classique. FAO Rome, 22-25 octobre.
29. Montgomery, R.E. (1921): On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya colony). J. Comp. Path. 34, 159-191, 243-262.
30. Moulton, J.E., Pan, I.C., Hess, W.R., De Boer, C.J. and Tessler, J. (1975): Pathologic features of chronic pneumonia in pigs with experimentally induced ASF. Am. J. Vet. Res. 36, 27-32.
31. O.I.E. Office international des Epizooties (1983): Peste porcine africaine en Italie. Information Epizootologique No. 1, 83/1/74.
32. Ordas, A., Sanchez Botija, C. and Diaz Irisani, S. (1981): Epidemiological studies on ASF in Spain. EEC/FAO Expert Consultation on ASF Research, Sardinia, 23-26 September.
33. Owen, L.N., Morgan, D.R. and Onions, D.E. (1975): Cultures of pig macrophages. Res. Vet. Sci. 18, 337-339.
34. Pan, J.C., De Boer, C.J. and Heuschele, W.P. (1970): Hypergammaglobulinemia in Swine infected with ASF virus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 134, 367-371.
35. Pan, J.C., De Boer, C.J., Hess, W.R. (1972): ASF: application of immunoelectroosmophoresis for the detection of antibody. Can. J. comp. Med. 36, 309-316.
36. Plowright, W., Parker, J., Peirce, M.A. (1969): The epizootology of ASF in Africa. Vet. Rec. 85, 668-674.
37. Plowright, W. (1969): ASF in ticks (*Ornithodoros moubata*, Murray) collected from animal burrows in Tanzania. Nature 221, 1071-1072.
38. Ribeiro, J.M., Rosa Azevedo, J.A., Teixeira, M.J.O., Braco Forte, M.C., Rodrigues Ribeiro, A.M., Oliveira Noronha, F., Grave Pereira, C. and Dias Vigario (1958): Peste porcine provoquée par une souche différente (Souche L) de la souche classique. Bull. Off. int. Epizoot. 50, 516-534.
39. Rolle, M. and Mayr, A. (1978): Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Enke-Verlag Stuttgart, 4. Auflage, 308-312.
40. Sanchez Botija, C. (1963): Reservorios del virus de la Peste Porcina Africana. Bull. Off. int. Epizoot. 60, 895-899.

41. Sanchez Botija, C. and Sanchez Botija, R. (1965): FAO. OIE. International Meeting on hog cholera and ASF. Rome.
42. Sanchez Botija, C., Ordas, A. and Garcia Gonzales, J. (1969): Investigation of the presence of antibody in pig in outbreaks of ASF with low mortality. Its diagnostic value. Bull. Off. int. Epizoot. 72, 841-847.
43. Sanchez Botija, C. (1970): Routine differential diagnosis of classical swine fever and ASF by means of immunofluorescence in combination with haemadsorption. Rivista Patron. Biol. Anim. 14, 139-158.
44. Sanchez Botija, C. (1970): Diagnosis of African Swine Fever by Immunofluorescence. Bull. Off. Epizoot. 73, 1025-1036.
45. Sanchez Botija, C., Ordas, A., Garcia Gonzales, J. (1971): Indirect immunofluorescence to detect antibodies to ASF. Its diagnostic value. Zooprofilassi 26, 111-128.
46. Sanchez Botija, C., Ordas, A., Gonzalez, F. and Solana, A. (1977): In "Agricultural Research Seminar on Hog Cholera / Classical Swine Fever and African Swine Fever", held at Tierärztliche Hochschule, Hannover, September 6-11. Directorate General for Agriculture. EEC Eur. 5904, Luxemburg.
47. Sanchez Botija, C. (1982): La peste porcine Africaine. Nouveaux développements. OIE 50. SG/7 24-29 Mai, 1-32.
48. Sanchez-Vizcaino, J.M. (1980): Workshop on ELISA. Final report. EEC Workshop on ELISA, Madrid 18-19 February, 12 pp.
49. Sanchez-Vizcaino, J.M., Tabares, E., Salvador, E. and Ordas, A. (1982): Standardization of the ELISA technique for detecting ASFV antibodies. FAO Santiago, Chile. ASF Newsletter (19) 7.
50. Spuhler, V. (1967): Ueber die afrikanische Schweinepest. Schw. Arch. Tierheilk. 109, (5), 275-280.
51. Stone, S.S. and Hess, W.R. (1967): Antibody response to inactivated preparations of African Swine Fever Virus in pigs. Am. J. Vet. Res. 28, (123), 475-481.
52. Stone, S.S., Deloy, P.D. and Sharman, E.C. (1968): The antibody response in pigs inoculated with attenuated ASFV. Can. J. Comp. Med. 32, 455-460.
53. Wardley, R.C. and Wilkinson, P.J. (1977): The growth of virulent African Swine Fever Virus in pig monocytes and macrophages. J. gen. Virol. 38, 183-186.

54. Wardley, R.C. et al. (1983): African Swine Fever. Brief Review. Arch. Virol. 76, 73-80.
55. Wilkinson, P.J., Lawman, J.P. and Johnston, R.S. (1980): ASP in Malta, 1978. Vet. Rec. 106, (5), 94-97.
56. Wilkinson, P.J., Wardley, R.C. and Williams, S.M. (1980): Experimental studies on pigs which recovered from ASF virus infection. EEC ASF Workshop Methodology of the diagnosis and spread of ASF. Lisbon, 2-3 December.
57. Wilkinson, P.J. (1984): Persistence of African Swine Fever. Consultation d'experts FAO/CEE sur la peste porcine africaine et la peste porcine classique. FAO Rome, 22-25 octobre.

LEBENS LAUF

POOL Romano geboren am 23. Dezember 1955 in Spino (Soglio, GR)

1962 - 1971 Besuch der Primar- und Sekundarschule in Vicosoprano

1971 - 1976 Kantonsschule Chur,
Matura Typus C.

1976 - 1977 Studienaufenthalt in Genf,
erstes Propaedeutikum

1977 - 1981 Studium und Staatsexamen an der Veterinär-Medizi-
nischen Fakultät der Universität Zürich

1982 Assistent in einer Grosstierpraxis

1983 - 1984 Doktorand am Eidg. Vakzine-Institut, Basel

VERDANKUNGEN

Die Untersuchungen wurden ermöglicht durch das Forschungsprojekt Nr. 012.83.8 des Bundesamtes für Veterinärwesen.

Der Verfasser dankt allen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, besonders aber:

- Herrn Dr. U. Kihm, Eidgenössisches Vakzine-Institut (EVI) für das Ueberlassen des Themas, die Unterstützung bei der Arbeit und Mithilfe bei der Niederschrift.
- Herrn Prof. Dr. R. Wyler, Institut für Virologie der Universität Zürich, für die Uebernahme des Referates.
- Herrn Prof. Dr. Hans Keller für die Uebernahme des Korreferates.
- Den Herren Dr. H.K. Müller und L. Bruckner (EVI) für die angenehme Zusammenarbeit und für manch guten Rat beim Lösen verschiedenster Probleme.
- Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Institutes für ihre wertvolle Mithilfe bei der Durchführung der Experimente.
- Frau M.A. Specklin für die sorgfältige Reinschrift des Manuskriptes.
- Frau S. Pletscher für die ausgezeichnete Anfertigung der Abbildungen.
- Herrn Dr. M. Lombard, Rhône Mérieux, F-Lyon für die kostenlose Lieferung des ASP ELISA.

